

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta Tese
será disponibilizado somente a partir
de 04/12/2020.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA**

Maria Priscila Franco Lacerda

**ESTUDO PROTEÔMICO PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS LINHAGENS
PADRÕES DE *Saccharomyces cerevisiae* DE ALTO RENDIMENTO NA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

**ARARAQUARA
DEZEMBRO/2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA**

Maria Priscila Franco Lacerda

**ESTUDO PROTEÔMICO PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS LINHAGENS
PADRÕES DE *Saccharomyces cerevisiae* DE ALTO RENDIMENTO NA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências Aplicadas à Farmácia da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara -
UNESP como pré-requisito para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof^a. Dra. Ana Marisa F. Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto

Dr. Paulo César Gomes

**ARARAQUARA
DEZEMBRO/2018**

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e
Documentação Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

L131e Lacerda, Maria Priscila Franco.
Estudo proteômico para o desenvolvimento de novas linhagens padrões de
Saccharomyces cerevisiae de alto rendimento na fermentação alcoólica / Maria
Priscila Franco Lacerda. – Araraquara, 2018.
229 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em
Biotecnologia e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração em
Biotecnologia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Coorientador: Álvaro de Baptista Neto.

Coorientador: Paulo César Gomes.

1. Leveduras. 2. Fermentação. 3. Metabolismo. 4. Proteômica. I. Almeida, Ana
Marisa Fusco, orient. II. Baptista Neto, Álvaro de, coorient. III. Gomes, Paulo César,
coorient. IV. Título.

CAPES: 40300005

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo a doutoranda contemplada com bolsa CNPQ.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus por iluminar meu caminho, me inspirar, e me encorajar em tantas horas nas quais os obstáculos eram tão grandes que meu único pensamento era desistir. Ele me provou que era possível e colocou no meu caminho todas as pessoas que aqui agradeço

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais José Hilton Lacerda e Maria Aparecida Lacerda pelo infinito e único amor, carinho e confiança. Meu maior presente divino é ser filha de vocês. Exemplos primordiais em minha vida, de força, determinação, bondade, humildade, honestidade (as pessoas mais honestas que conheço), e como todos dizem, exemplo de casal mais fofo (e grude) que há.

Agradeço à minha irmã Tatiane, por todo amor e carinho à mim e aos meus pais, pois desde que eu saí de casa você teve que dar conta de muitas coisas sozinha, ouvindo broncas da Cidinha em dobro...Obrigada por ser doidinha igual a mim, me escutar, por nossas fofocas, e por fazer doces quando vou para casa.

Agradeço ao meu “Vô” João que lá de cima me abençoa, ainda o escuto me chamando de Priscilinha sentado em sua cadeira na varanda de casa e falando que tudo vai dar certo, o senhor foi um presente lindo em minha vida.

Agradeço a minha “Vó” Nina por todo carinho e apoio, por ser exemplo de uma mulher tão vívida, e por nossos deliciosos momentos de tereré e mate com suas mirabolantes histórias.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dr. Ana Marisa Fusco Almeida pela oportunidade concedida e por acreditar em mim, pela orientação, confiança, e pelos ensinamentos concedidos desde minha chegada ao laboratório. Obrigada por fazer parte do meu crescimento profissional e pessoal!

Agradeço a Profa. Dr. Maria José Giannini por todo apoio e ensinamentos, e pelo exemplo de liderança e pesquisadora.

Agradeço ao meu coorientador Prof. Dr. Álvaro Baptista pelo imenso apoio e ensinamentos desde o início do doutorado, desde os longos experimentos em biorreator até os cálculos de análise, contar com sua ajuda foi essencial.

Agradeço ao meu coorientador Dr. Paulo César Gomes pela amizade e imenso apoio nas horas em que precisei, principalmente durante minha qualificação, e ainda suas tentativas de entender meus confusos pensamentos. Obrigada pelo exemplo de dedicação pela pesquisa.

Agradeço ao bioinformata Dr. Tiago Lopes, pela orientação e ajuda nas análises de bioinformática, assim como seu grande apoio nessa reta final. Nossas conversas abriram minha mente em muitos aspectos. Sua disposição em me ajudar foi admirável, obrigada.

Agradeço a oportunidade de coorientar à aluna de iniciação científica Angélica e por sua imensa ajuda nos diversos experimentos. Sua força de vontade e dedicação são admiráveis, e contar com seu apoio foi fundamental para execução deste projeto.

Agradeço aos meus amigos do Núcleo de Proteômica pelas conversas com muito café nos intervalos dos experimentos, principalmente Mônica, Janja, Panta, Claudinha, Nayla, Mariana, Nati, Junya, Haroldo, Carol MG, Larissa, Lariane, Natália e Niúra. Obrigada por toda a ajuda e por todos os bons momentos vividos fora e dentro do ambiente de trabalho.

Agradeço a Junya pelo imenso apoio e amizade, sua disposição em me ajudar em qualquer coisa não tenho como agradecer, além, claro, de ouvir meus choros no laboratório.

Agradeço as minhas amigas Bruna e Mônica pelo companheirismo nesses anos em que moramos juntas, nossas conversas, fofocas, trapalhadas e risadas me deixam com muita saudade.

Agradeço aos meus companheiros de “rolê” Fernanda, Juanito, Lost e Natan, pela amizade e parceria de sucesso nos eventos unespianos e na República Alambik. Vocês foram fundamentais para eu conseguir seguir em frente em Araraquara.

Agradeço ao Núcleo de Proteômica por toda estrutura que possibilitou a realização deste projeto.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e o Programa de Pós-Graduação em Biociência e Biotecnologia aplicadas à Farmácia pelo apoio.

Agradeço ao CNPQ pela bolsa de doutorado concedida a mim.

“Mistakes teach you important lessons. Every time you encounter one, you’re a step closer to your goal.”

“Have the courage to follow your heart and intuition. They somehow know what you truly want to become.”

“We’re here to put a dent in the universe. Otherwise why else even be here?”

- Steve Jobs

Sumário

RESUMO	15
ABSTRACT	17
Capítulo 1 – Tese.....	19
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Produção de etanol no Brasil.....	17
1.1.1. Fatores de estresse	17
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : generalidades e linhagens resistentes.....	20
1.3. Proteômica como ferramenta no desenvolvimento de novas linhagens.....	21
1.3.1. Tecnologias para análise do proteoma	21
1.3.2. Proteômica no cenário de biocombustíveis	24
1.4. Bioinformática.....	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral	29
2.2. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Micro-organismos	30
3.2. Inóculo.....	30
3.3. Fermentação	31
3.3.1. Sistemas de Fermentação	31
3.6. Avaliação de Integridade da membrana citoplasmática	31
3.7. Análise por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).....	31
3.7.1. Velocidade de Consumo.....	32
3.7.2. Cálculo de parâmetros utilizados na modelagem do processo fermentativo	32
3.8. Análise Estatística	33
3.9. Análise Proteômica	33
3.9.1. Procedimento de lise celular e obtenção da fração proteica.....	33
3.9.2. Eletroforese por técnica de SDS-PAGE.....	34
3.9.2. Digestão enzimática	34
3.9.3. Análise de proteínas por abordagem <i>shotgun</i>	35
3.9.4. Identificação de proteínas.....	35
3.9.5. Análise Funcional dos dados de proteômica	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Fermentação	37
4.1.1. Fermentação sob condição de estresse a 12% de etanol	37
4.3. Avaliação de Integridade da membrana citoplasmática.....	41
4.4. Análise Proteômica	43
4.4.1. Análise da resposta ao estresse a etanol	43
4.4.2. Análise Funcional.....	47
4.4.2.1. Funções moleculares	47
4.4.2.2. Localizações celulares.....	54
4.4.3. Identificação de Vias metabólicas.....	60
4.4.4. Análise Funcional de Proteínas exclusivas de componentes membranares.....	66
4.4.4.1. Funções moleculares	66
4.4.4.2. Localização celular.....	74
4.4.4.2. Interação Proteína-Proteína (PPI).....	79
5. CONCLUSÕES	93
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

Capítulo 2 – Artigos	107
1. Artigo (Submetido) durante o Doutorado	108
1.1. Methodologies and applications of Proteomics for study of Yeast Strains: an update.	108
1.2. Artigo em Preparação	109
2. Artigos de coautoria publicados durante o Doutorado	110
2.1. Phenotypic Characterization of Yeasts Aiming at Bioethanol Production	110
2.2. Transcriptional profile of a bioethanol production contaminant <i>Candida tropicalis</i>	111
ANEXOS	114
ANEXO A - Resultados correspondentes à Análise de Integridade de membrana citoplasmática (Figura 3).	115
ANEXO B - Classificação de Ontologia Genética relacionada às proteínas exclusivas identificadas entre os tempos de fermentação analisados para cada cepa em estudo.	124
ANEXO C – Análise de Enriquecimento das Vias Metabólicas associadas às proteínas exclusivas identificadas entre os tempos de fermentação analisados para cada cepa em estudo.	157
ANEXO D - Classificação de Ontologia Genética relacionada às proteínas exclusivas classificadas como pertencentes à componentes membranares.	165
ANEXO E – Proteínas já relacionadas ao estresse a etanol na literatura, utilizadas como alvos nas análises de Interação Proteína-Proteína.	200
ANEXO F – Proteínas associadas aos complexos funcionais identificados durante cada situação de estresse para cada cepa em estudo.	205

Lista de Figuras

Figura 1. Perfis de fermentação sem indução de estresse em meio sintético. São apresentados os processos de fermentação sem indução de estresse em relação ao consumo de substrato (A), e em relação à produção de etanol (B), para cada levedura em estudo (utilizando modelo de fermentação). Dados expressos como média e desvio padrão.	39
Figura 2. Perfis de fermentação com indução de estresse a etanol 12% em meio sintético. São apresentados os processos de fermentação com indução de estresse em relação ao consumo de substrato (A), e em relação à produção de etanol (B), para cada levedura em estudo (utilizando modelo de fermentação). Dados expressos como média e desvio padrão.	40
Figura 3. Análise de Integridade da membrana plasmática utilizando citometria de fluxo. As análises de fluorescência foram quantificadas em relação ao tempo durante a fermentação com indução de estresse a etanol 12%. Dados expressos como média e desvio padrão. * $p < 0,05$, comparado com os respectivos grupos controle.	43
Figura 4. Análise em SDS-PAGE de migração de proteínas das amostras analisadas neste trabalho.	44
Figura 5. Diagramas de Venn ilustrando os números de proteínas exclusivas e igualmente identificadas durante a fermentação com indução de etanol 12% (0h_12% e 4h_12%) em relação à fermentação controle (0h_Control) para cada cepa em estudo. (A) Cepas PE-2; (B) CAT-1; e (C) Y-12632.	45
Figura 6. Análise de Ontologia Genética para a cepa industrial PE-2. Rede das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas, segundo suas funções moleculares em referência aos tempos analisados.	51
Figura 7. Análise de Ontologia Genética para a cepa industrial CAT-1. Rede das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas, segundo suas funções moleculares em referência aos tempos analisados.	52
Figura 8. Análise de Ontologia Genética para a cepa selvagem Y-12632. Rede das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas, segundo suas funções moleculares em referência aos tempos analisados.	53
Figura 9. Análise de Ontologia Genética para a cepa industrial PE-2. Rede das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas, segundo seus componentes celulares em referência aos tempos analisados.	57
Figura 10. Análise de Ontologia Genética para a cepa industrial CAT-1. Rede das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas, segundo seus componentes celulares em referência aos tempos analisados.	58
Figura 11. Análise de Ontologia Genética para a cepa selvagem Y12632. Rede das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas, segundo seus componentes celulares em referência aos tempos analisados.	59
Figura 12. Mapeamento de vias metabólicas identificadas frente às proteínas exclusivas encontradas na cepa industrial PE-2.	63
Figura 13. Mapeamento de vias metabólicas identificadas frente às proteínas exclusivas encontradas na cepa industrial CAT-1.	64
Figura 14. Mapeamento de vias metabólicas identificadas frente às proteínas exclusivas encontradas na cepa selvagem Y-12632.	65
Figura 15. Diagramas de Venn ilustrando os números de proteínas exclusivas de componentes membranares e igualmente identificadas durante a fermentação com indução de etanol 12% (0h_12% e 4h_12%) em relação à fermentação controle (0h_Control) para cada cepa em estudo. (A) Cepas PE-2; (B) CAT-1; e (C) Y-12632.	66
Figura 16. Redes das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas	

relacionadas à membrana, segundo suas funções moleculares para a cepa industrial PE-2. ...	71
Figura 17. Redes das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas relacionadas à membrana, segundo suas funções moleculares para a cepa industrial CAT-1.	72
Figura 18. Redes das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas relacionadas à membrana, segundo suas funções moleculares para a cepa selvagem Y12632.	73
Figura 19. Redes das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas relacionadas à membrana, segundo seus componentes celulares para a cepa industrial PE-2.	76
Figura 20. Redes das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas relacionadas à membrana, segundo seus componentes celulares para a cepa industrial CAT-1.	77
Figura 21. Redes das Interações entre as classificações GO das proteínas exclusivas relacionadas à membrana, segundo seus componentes celulares para a cepa selvagem Y12632.	78
Figura 22. Representação gráfica da rede de interação proteína-proteína das proteínas exclusivas localizadas em componentes membranares, em referência ao tempo 0h sem estresse para a cepa industrial PE-2.....	84
Figura 23. Representação gráfica da rede de interação proteína-proteína das proteínas exclusivas localizadas em componentes membranares, em referência ao tempo 0h com estresse a etanol 12% para a cepa industrial PE-2.....	85
Figura 24. Representação gráfica da rede de interação proteína-proteína das proteínas exclusivas localizadas em componentes membranares, em referência ao tempo 4h com estresse a etanol 12% para a cepa industrial PE-2.....	86
Figura 25. Representação gráfica da rede de interação proteína-proteína das proteínas exclusivas localizadas em componentes membranares, em referência ao tempo 0h sem estresse para a cepa industrial CAT-1.	87
Figura 26. Representação gráfica da rede de interação proteína-proteína das proteínas exclusivas localizadas em componentes membranares, em referência ao tempo 0h com estresse a etanol 12% para a cepa industrial CAT-1.	88
Figura 27. Representação gráfica da rede de interação proteína-proteína das proteínas exclusivas localizadas em componentes membranares, em referência ao tempo 4h com estresse a etanol 12% para a cepa industrial CAT-1.	89
Figura 28. Representação gráfica da rede de interação proteína-proteína das proteínas exclusivas localizadas em componentes membranares, em referência ao tempo 0h sem estresse para a cepa selvagem Y12632.....	90
Figura 29. Representação gráfica da rede de interação proteína-proteína das proteínas exclusivas localizadas em componentes membranares, em referência ao tempo 0h com estresse a etanol 12% para a cepa selvagem Y12632.....	91
Figura 30. Representação gráfica da rede de interação proteína-proteína das proteínas exclusivas localizadas em componentes membranares, em referência ao tempo 4h com estresse a etanol 12% para a selvagem Y12632.	92

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros previstos para os modelos propostos baseado na equação de Ghose-Tyagi.....	39
Tabela 2. Velocidade Estimada de consumo de substrato em relação ao tempo durante o sistema de fermentação em meio sintético com concentração industrial de substrato (200 g/L) sem indução de estresse, e com indução de estresse a etanol 12%.	41
Tabela 3. Classificações de Ontologia Genética segundo as Funções Moleculares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa industrial PE-2.	49
Tabela 4. Classificações de Ontologia Genética segundo as Funções Moleculares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa industrial CAT-1.	49
Tabela 5. Classificações de Ontologia Genética segundo as Funções Moleculares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa selvagem Y-12632.	50
Tabela 6. Classificações de Ontologia Genética segundo as Localizações Celulares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa industrial PE-2.	56
Tabela 7. Classificações de Ontologia Genética segundo as Localizações Celulares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa industrial CAT-1.	56
Tabela 8. Classificações de Ontologia Genética segundo as Localizações Celulares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa selvagem Y-12632.	56
Tabela 9. Classificações de Ontologia Genética segundo as Funções Moleculares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa industrial PE-2.	69
Tabela 10. Classificações de Ontologia Genética segundo as Funções Moleculares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa industrial CAT-1.	69
Tabela 11. Classificações de Ontologia Genética segundo as Funções Moleculares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa selvagem Y-12632.	70
Tabela 12. Classificações de Ontologia Genética segundo as Localizações Celulares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa industrial PE-2.	75
Tabela 13. Classificações de Ontologia Genética segundo as Localizações Celulares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa industrial CAT-1.	75
Tabela 14. Classificações de Ontologia Genética segundo as Localizações Celulares de maior enriquecimento entre os tempos analisados para a cepa selvagem Y-12632.	75

Lista de Abreviaturas

%	porcentagem
°C	graus Celsius
2D-DIGE	<i>two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis</i>
2D-PAGE	<i>Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i>
AU	absorbância
ACN	acetonitrila
ATPase	adenosinatrifosfatases
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CH ₂ O ₂	ácido fórmico
cm	centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DTT	dithiothreitol
ESI/IT	sistema eletrospray - Ion trap
GO	Ontologia Genética
GPI	glicosilfosfatidilinositol
h	horas
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
HSP	<i>heat shock protein</i>
ICAT	<i>Isotope-coded affinity tag</i>
ITRAQ	<i>Isobaric tags for relative and absolute quantitation</i>
KCl	cloreto de potássio
KDa	quiloDalton
L	litro
LC/MS	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>
M	molar
m/z	razão massa/carga
MALDI-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MPa	megapascal
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	cloreto de sódio
NH ₄ CO ₃	Bicarbonato de amônio
nm	nanômetro
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PI	Iodeto de Propídio
PMSF	fenil-metil-sulfonil fluoreto
PPI	Interações Proteína-Proteína
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SGD	<i>Saccharomyces genome database</i>
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture</i>
TCA	ácido Tricloroacético
TFA	ácido trifluoroacético
TMT	<i>Tandem mass tags</i>
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
UFLC	<i>Ultra-Fast liquid Chromatography</i>
VHGF	fermentação de alta gravidade
x g	força G
YEPD	extrato de levedura-peptona-dextrose
µg	micrograma
µL	microlitros
µM	micro molar
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
PTM	Modificações pós-traducionais

RESUMO

As células eucarióticas desenvolveram diversas estratégias para combater os efeitos nocivos de uma variedade de condições estressantes. Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tem uma capacidade inata de suportar altos níveis de etanol que se tornariam letais ou prejudiciais à fisiologia de outros organismos. A resposta de estresse sob alta concentração de etanol em *S. cerevisiae* é importante em reações de fermentação e opera através da superexpressão e subexpressão de genes, alterando o perfil proteico e podendo resultar em perturbações do bioprocesso. O objetivo deste estudo foi determinar as diferenças no metabolismo de cada cepa de levedura visando à obtenção de informações a respeito da resistência à alta concentração de etanol a 12%. Para isso, as linhagens industriais PE-2 e CAT-1, e a linhagem Y12632 de *S. cerevisiae* isolada de processo de produção de etanol, foram utilizadas para a realização de testes em meio sintético contendo etanol 12%, simulando uma situação de estresse ocorrente em processos industriais para produção de etanol. Sendo assim, para avaliar essa resposta durante o estresse, a caracterização do processo fermentativo e a análise de integridade da membrana celular foram relacionadas à análise proteômica por *shotgun*. Principalmente através da avaliação de integridade da membrana citoplasmática, a cepa PE-2 demonstrou elevada resistência, além de alto consumo de substrato durante a fermentação com estresse induzido em comparação com a cepa industrial CAT-1, e a cepa selvagem Y12632. Em paralelo, a partir da análise proteômica foi possível a identificação de possíveis características que podem estar ligadas ao melhor perfil de resistência da cepa PE-2, como as funções de filamento de actina e metiltransferase com maior enriquecimento funcional no tempo de 4h em estresse, proteínas transportadoras transmembranares de substâncias, a proteína TPS1 (Biossíntese da trealose), assim como a Biossíntese de O-glican e glicanos (manose) no que diz respeito às vias metabólicas. Vale a pena ressaltar que para as três cepas analisadas as funções moleculares relacionadas às proteínas exclusivas de membrana estão fortemente relacionadas com funções transportadoras quando submetidas ao estresse ao etanol. Sugerindo assim, que o estresse ao etanol possa ter induzido maior atividade de proteínas transportadoras, cuja função está sendo cada vez mais exaltada em processos biotecnológicos. Outro ponto de evidência neste estudo foi a identificação de proteínas que interagem com proteínas já associadas ao estresse a etanol na literatura, essa integração fornece um melhor entendimento e usabilidade das redes preditas, o

que pode ser valioso para seleção de novos alvos biológicos potenciais para o desenvolvimento de cepas resistentes ao estresse a etanol durante processos fermentativos.

Palavras-chave: leveduras, fermentação, metabolismo, proteômica.

ABSTRACT

Eukaryotic cells have developed several strategies to combat the harmful effects of a variety of stressful conditions. Strains of *Saccharomyces cerevisiae* have an innate ability to withstand high levels of ethanol that are usually lethal or detrimental to the physiology of other organisms. The stress response under high ethanol concentration in *S. cerevisiae*, which is important for fermentation reactions, promotes up or downregulation of some genes, that results in alterations in protein profile. The objective of this study was to determine the differences in the metabolism of each strain of yeast aiming to obtain information about resistance to high concentration of ethanol (12%). For this, two industrial strains, PE-2 and CAT-1, and one wild strain (Y12632), isolated from the ethanol production process, from *S. cerevisiae* were used to perform tests in synthetic medium containing 12% of ethanol, simulating a stress situation that occurs in industrial processes during the production of ethanol. Thus, the evaluation of response during stress, the characterization of the fermentative process and the analysis of cellular membrane integrity were related to the proteomic analysis by shotgun. Particularly through the evaluation of cytoplasmic membrane integrity, the PE-2 strain demonstrated high resistance, as well as high substrate consumption during induced stress fermentation, compared to the CAT-1 industrial strain and the wild strain Y12632. In parallel, from the proteomic analysis it was possible to identify possible characteristics that may be related to the best resistance profile of the PE-2 strain, such as the actin filament and methyltransferase functions with the highest functional enrichment in the time of 4h in stress, transmembrane substance transporter proteins, the TPS1 protein (Trehalose biosynthesis), as well as the biosynthesis of O-glycan and glycans (mannose) with respect to the metabolic pathways. It is worth mentioning that for the three analyzed strains the molecular functions related to membrane-exclusive proteins are strongly related to transport functions when subjected to ethanol stress. Thus, the stress on ethanol may have induced greater activity of transport proteins, whose function is being increasingly exalted in biotechnological processes. Another point of evidence in this study was the identification of proteins that interact with proteins already associated with ethanol stress in the literature, this integration provides a better understanding and usability of the predicted networks, which may be valuable for the selection of new potential biological targets for the development of stress resistant strains to ethanol during fermentative processes.

Keywords: yeasts, fermentation, metabolism, proteomics.